动 物 学 研 究 2006，Oct. 27（5）：541－548　　CN 53－1040/Q　ISSN 0254－5853
Zoological Research

核糖体失活蛋白抗 HIV-1 作用的研究进展

王建华[1,2,3]，欧阳东云[1,2]，王媛媛[1,2]，郑永唐[1,*]
（1. 中国科学院昆明动物研究所 动物模型与人类疾病机理重点实验室分子免疫药理学实验室，云南 昆明　650223；
2. 中国科学院研究生院，北京　100049；
3. Department of Microbiology and Molecular Genetics，Medical College of Wisconsin，Milwaukee，WI　53226，USA）

摘要：核糖体失活蛋白（RIPs）抗 HIV-1 活性研究已有十几年的历史。RIPs 类化合物代表了抗 HIV/AIDS 天然产物或先导化合物发展的一个重要方向。本文从介绍 RIPs 的酶活性及其抗 HIV-1 活性入手，对 RIPs 抗 HIV-1 的可能机制，从与 RIPs 酶活性的关系、诱导 HIV-1 感染细胞的凋亡及相应的信号转导、诱发活性氧的产生，以及对 HIV-1 整合酶的抑制作用等几个方面做了较详尽的阐述，并对 RIPs 的结构修饰和抗 HIV-1 构效关系进行了综述。对 RIPs 类化合物在抗病毒领域进行深入而系统地研究，能拓宽其在抗 HIV/AIDS 临床上的进一步应用。

关键词：核糖体失活蛋白；天花粉蛋白；RNA-N 糖苷酶；抗病毒机制；HIV-1
中图分类号：Q591.2　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0254－5853（2006）05－0541－08

Progress in Anti-HIV-1 Actions of Ribosome Inactivating Proteins

WANG Jian-hua[1,2,3]，OUYANG Dong-yun[1,2]，WANG Yuan-yuan[1,2]，ZHENG Yong-tang[1,*]
(1. Key Laboratory of Animal Models and Human Diseases Mechanisms, and Laboratory of Molecular Immunopharmacology, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan　650223, China;
2. Graduate School, the Chinese Academy of Sciences, Beijing　100049, China;
3. Department of Microbiology and Molecular Genetics, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI　53226, USA)

Abstract: The anti-HIV-1 research history of ribosome inactivating proteins (RIPs) can be traced back to McGrath's work in 1989. They are important representatives, which guide further research, of natural anti-HIV products or leading compounds. The enzymatic activities and anti-HIV-1 actions of RIPs were introduced initially in this paper, followed by a detailed discussion about the potential anti-HIV-1 mechanisms. The discussion mainly focuses on the relationships with anti-HIV-1 enzymatic activities, induction of apoptosis of HIV-1 infected cells and responding cell signaling, the production of reactive oxygen species, the HIV-1 integrase inhibition effect. The anti-HIV-1 structure-functional relationship of RIPs and the structural modifications were also covered. Systemic and intensive studies of RIPs' antiviral actions will increase their possibility as clinical anti-HIV/AIDS agents.

Key words: Ribosome inactivating protein; Trichosanthin; RNA-N Glycosidase; Antiviral mechanism; HIV-1

人免疫缺陷病毒（Human Immunodeficiency Virus，HIV）是导致艾滋病（Acquired Immunodeficiency Syndrome，AIDS）的病原体。目前，AIDS 严重威胁着人类的健康和全球经济的发展。据卫生部统计，截至 2005 年底，中国有 HIV 感染者约 65 万人，2004 年因艾滋病死亡的人数约 2.5 万，一年中

* 收稿日期：2006－06－09；接受日期：2006－08－11
基金项目：国家自然科学基金（39970851）；国家“十五”科技攻关计划（2004BA719A14）；中国科学院知识创新工程（KSCX2-SW-216；KSCX1-SW-11）；云南省自然科学基金（96C095M；1999C0087M；2002C0066M）；云南省科技攻关计划（2004NG12）资助课题
* 通讯作者（Corresponding author），Tel/Fax：871－5195684；E-mail：zhengyt@mail.kiz.ac.cn

新感染的患者有 7 万人。如不采取有效措施，我国改革开放以来所取得的成果将付诸东流。因此，我国应该加强 HIV/AIDS 预防、诊断及治疗的基础和应用研究。2006 年 2 月国务院发布的“国家中长期科学和技术发展规划纲要”（2006—2020 年）已将“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”作为 16 个重大专项之一，明确为我国科技发展重中之重。

核糖体失活蛋白（ribosome inactivating proteins，RIPs）是一类广泛存在于植物或微生物中，能够作用于真核或原核细胞的核糖体并抑制蛋白质合成的天然毒蛋白。根据肽链的组成和性质，RIPs 通常分为两类：Ⅰ型为单链；Ⅱ型为双链，由一条类似Ⅰ型 RIP 的肽链和一条具有凝集素活性的肽链通过二硫键连接形成。RIPs 具有引产、抗真菌、抗病毒和抗肿瘤等广泛的生物学和药学活性。RIPs 已被用作免疫毒素的弹头，临床上治疗恶性肿瘤（Wang，2000；Aron et al，1980；Lam et al，2001；Lee-Huang et al，1995；Schnell et al，2003；Shih et al，2001；Ussery et al，1977；Wang et al，1998；Waurzyniak et al，1997；Zheng et al，1995）。RIPs 抗 HIV 活性的发现进一步拓宽了其在抗病毒领域的应用。

迄今已发现近 30 种具有抗 HIV 活性的 RIPs。RIPs 以其独特的抗病毒活性代表了天然化合物在抗 HIV 药物研究中一个重要的发展方向。学者们对具有抗 HIV 活性的 RIPs 进行了较系统的研究，在探讨抗病毒机制、构效关系、通过结构修饰和改造以降低免疫原性和延长血浆半衰期等方面取得了一定的成果（Wang et al，2002，2003，2004；Wang，2005）。从 20 世纪 90 年代初期开始至今，在国家自然科学基金、云南省自然科学基金和中国科学院知识创新工程等多项基金项目支持下，我们在寻找新的具有抗 HIV-1 活性 RIPs，天花粉蛋白（trichosanthin，TCS）的抗 HIV-1 活性、机制、构效关系和应用等方面也做了较系统的研究，发表了一系列的学术论文。本文将结合笔者 10 多年的研究结果，对 RIPs 的抗 HIV-1 作用、机制、构效关系以及酶活性的研究进行较全面的综述。

1 RIPs 的酶活性

1.1 RNA N – 糖苷酶活性

RIPs 的 RNA N – 糖苷酶活性是指 RIPs 识别真核生物 28*S* rRNA 或原核生物 23*S* rRNA 上高度保守的 sarin/ricin 结构域（S/R 结构域），分别剪切 4 324 和 2 619 位腺嘌呤与核苷 N-C 糖苷键。S/R 结构域具有独特的茎环结构，其中茎由 6—7 个碱基对组成，环则由 14 个高度保守的富含嘌呤的核苷酸组成，环内包含相同的 GAGA 序列（Wang，2000）。蓖麻毒蛋白（ricin）A 链能水解由 35 个碱基组成的、与 S/R 结构域序列相同的寡核糖核苷酸，说明 S/R 结构域本身就具备了能被 ricin A 链专一识别并水解糖苷键的全部结构信息（Endo et al，1988）；但 RIPs 仍存在着底物的特异性。大部分Ⅰ型 RIPs 具有较广的底物特异性；而Ⅱ型 RIPs 则选择性地作用于动物的核糖体，如 PAP 能作用于植物、细菌、酵母以及低等或高等动物的核糖体。ricin A 链只作用于哺乳动物与酵母的核糖体，却不能使植物和大肠杆菌的核糖体失活。与 RIPs 相结合的核糖体蛋白的保守性可能与 RIPs 的底物特异性有一定的关系。ricin A 链能够结合鼠肝核糖体蛋白 L9 和 L10e；而 PAP 则能与酵母核糖体蛋白 L3 结合，L3 在不同来源的核糖体中是高度保守的（Wang，2000）。

1.2 多聚核苷：腺苷/鸟苷糖苷酶活性和其他酶活性

RIPs 最初被认为只作用于核糖体 RNA。近年来，人们陆续发现 RIPs 除了专一性地作用于核糖体 S/R 结构域外，一些 RIPs 对多聚核苷酸，如 DNA、tRNA、poly（A）等也有脱腺嘌呤作用（Peumans et al，2001）。来源于 *Saponaria officinalis* 的Ⅰ型 RIPs 的 Saporin-L1 也能够使多种核苷酸底物脱去腺嘌呤，这些核苷酸底物包括鲑精 DNA、tRNA、poly（A）以及烟草花叶病毒（tobacco mosaic virus，TMV）RNA（Barbieri et al，1997）。除了腺嘌呤碱基外，RIPs 也能脱去真核生物和原核生物的鸟嘌呤碱基。ricin A 处理鼠核糖体导致 G4323 从 S/R 区域脱落（Endo et al，1987），重组 PAP 使大肠杆菌 rRNA 失去鸟嘌呤（Rajamohan et al，1999a），而 Hudak et al（2000）报道野生型 PAP 还能够使兔网织红细胞、烟草以及酵母核糖体脱去 4 323 位的 G 碱基。

另据报道，RIPs 还可能具有 DNA 酶、RNA 酶、5-AMP 磷酸酯酶、核酸内切酶活性、超氧化物歧化酶活性等，但绝大部分这些酶活性的检测并不能排除污染的可能（Chen et al，1996；Hu & Liu，1994；Wang，2000；Li et al，1991）。

2 具有抗 HIV-1 活性的 RIPs

我们曾对 57 种来源于 7 科 17 种高等植物的 RIPs 进行抗 HIV-1 活性初筛，发现不同来源的栝楼蛋白（trichobitacin）、南方栝楼蛋白峰Ⅴ、南方栝楼蛋白峰Ⅵ均显著地抑制 HIV-1 诱导的 C8166 的细胞病变；巴Ⅱ、丝瓜子蛋白、丝瓜子蛋白峰Ⅲ、苦瓜子小分子蛋白、油瓜根 2、漆漆子蛋白及纯化成分有一定的抑制作用（SI 在 10—50 之间）；从某些植物中提取的粗提物（如老鼠拖瓜蛋白、大叶木鳖子根蛋白、西双版纳根Ⅱ等）有显著抑制 HIV-1 复制的作用，但进一步纯化分离的成分却丧失了活性，这可能与样品纯化后溶解度差、反复提纯和冷冻干燥后活性损失有关(Zheng, 1997; Zheng et al, 1998, 1999, 2000)。在苦瓜子蛋白（momorcharin，MMC）中，只有 α-MMC 具有抗 HIV-1 活性，而 β-MMC 和 γ-MMC 没有发现有抗 HIV-1 活性（Zheng et al，1999）。RIPs 对慢性 HIV-1 感染细胞中的病毒复制没有影响（Zheng et al，1999，2000）。以上结果表明，并非具有核糖体失活活性（ribosome inactivating activity，RI）的 RIPs 就一定有抗 HIV-1 作用，必然有其他抗 HIV-1 作用的机制参与，RIPs 抗 HIV-1 的作用靶点在病毒复制的早期或者通过感染细胞本身而发挥抗病毒作用。

在已发现具有抗 HIV-1 的 RIPs 中，除上述提及的 RIPs 外，还包括栝楼根抗病毒蛋白 TAP29、苦瓜子抗病毒蛋白 MAP30、异株泻根蛋白（Bryodin）、美洲商陆抗病毒蛋白 PAP、多花白树抗 HIV 蛋白 GAP31，以及香石竹抗 HIV 蛋白 30 和 32。此外，还有从蘑菇 *Lyophyllum shimeji* 孢子体中提取的 Lyophyllin（20 kDa）和 LAP（14 kDa）、从蘑菇 *Hypsizigus marmoreus* 和 *Flammulina velutipes* 孢子体中提取的 Hypsin（20 kDa）和 Velutin（13.8 kDa）、从中国产人参 *Panax ginseng* 根中分离到的 Panaxagin、从西洋参 *Panax quinquefolium* 根中提取的 Quinqueginsin 等（Zheng & Ben，1997；Wang et al，2004）。

3 RIPs 抗 HIV-1 的机制研究

3.1 RIPs 抗 HIV-1 活性与酶活性

多数学者认为 RIPs 抗 HIV-1 活性 RI 活性，即 RNA-N 糖苷酶活性有关。为了确定 RI 活性与抗 HIV-1 作用之间的关系，我们通过蛋白工程技术构建了具有不同程度 RI 活性的一系列 TCS 突变体，研究 TCS 抗 HIV-1 作用的构效关系。TCS 是我国科学家 20 世纪 70 年代发现的至今为数不多的原创性药物，在我国临床中曾广泛应用于引产（Wang，2000）。TCS 也是第一个被发现具有抗 HIV-1 作用的 RIPs（McGrath et al，1989）。Ⅰ/Ⅱ期临床证明，TCS 对 AIDS 和 ARC（AIDS-related complex）患者均具有明显的疗效，如血清中 p24 抗原水平降低，$CD4^+$T 细胞数量增加（Kahn et al，1994）。TCS 抗 HIV-1 作用的发现重新引起了科学界对 RIPs 类化合物的关注。

我们检测了 TCS 的 RI 活性中心、抗原决定簇、蛋白 C－末端等系列突变体的体外抗 HIV-1 活性，其结果表明，TCS 的抗 HIV-1 与 RI 活性显著相关。TCS 抗 HIV-1 活性与 RI 活性呈现平行下降的趋势，当 RI 活性下降到 30.30%—50.00%（TCS_{C2}、TCS_{C4}和 TCS_{C14}等 C－末端突变体）时，抗 HIV-1 活性也下降到 20.83%—71.43%；当 RI 活性下降到 0.63%时（TCS_{R122G}，活性中心突变体），仍具有一定的抗 HIV-1 活性；但当 RI 活性下降到 0.06%（$TCS_{E160A/E189A}$，活性中心突变体）时，几乎失去抗 HIV-1 活性；RI 活性失去到 0.03 %（$TCS_{M(120-123)}$，活性中心突变体）的 TCS，则完全丧失了其抗 HIV-1 活性。然而，有趣的是，我们发现了两个例外的突变体：TCS_{19aa}和 TCS_{KDEL}。构建表达这两个突变体的原意是为了增加 TCS 的入胞效率，分别在 TCS C 末端增加 19 个氨基酸尾肽和 KDEL 信号肽。与天然 TCS 相比，这两个突变体 RI 活性并没有表现出显著性下降，而抗 HIV-1 活性则显著下降。揭示出 TCS 的抗 HIV-1 作用存在着除 RI 活性之外的其他机制(Wang et al, 2002, 2003, 2004; Wang, 2005)。

PAP 的抗 HIV-1 活性则可能与其利用腺苷酶活性诱导 HIV-1 RNA 脱嘌呤作用有关。PAP 是从商陆科植物美洲商陆叶中分离纯化的单链 RIPs（30 kDa）。PAP 具有广谱抗动物和植物病毒活性，包括脊髓灰质炎病毒（poliovirus）、单纯疱疹病毒（herpes simplex virus，HSV）、流感病毒（influenza virus）、巨细胞病毒（cytomegalovirus，CMV）、TMV 以及 HIV-1。PAP 能够使 HIV-1 RNA、TMV RNA 脱去腺嘌呤，而没有抗 HIV-1 活性的 ricin A，则不能使 HIV-1 脱去腺嘌呤（Rajamohan et al，1999b）。进一步研究表明，PAP 能够通过结合转录因子

eIFiso4G 和 eIF4G 而接近病毒的 RNA，利用其腺苷酶活性诱导病毒 RNA 脱嘌呤（Wang et al，2006）。另一方面，胞质中游离的腺嘌呤能够选择性诱导 HIV-1 慢性感染细胞的凋亡（Hirasawa et al，2000）。我们研究也发现，TCS 也能以剂量依赖效应使裸露的 HIV-1 RNA 脱去腺嘌呤（Wang，2005）。HIV-1 进入细胞后以自己 RNA 为模板合成双链 DNA，然后整合到宿主细胞染色体上，最后在合适条件下，转录出病毒 RNA 并装配成新的病毒颗粒。在这个生活周期中，其核酸有整合态和游离态（包括 ssRNA、RNA：DNA、dsDNA）两种形式，其中是否存在着类似 S/R 的二级结构或其他能被 RIPs 所识别的构象值得进一步研究。然而并不是所有 RIPs 都有抗 HIV-1 作用，看来单纯的酶活性并不能完全解释 RIPs 的抗 HIV-1 活性（Zheng et al，1998）。

3.2 RIPs 抗 HIV-1 活性与感染细胞凋亡

从体内清除 HIV 慢性感染细胞是 HIV/AIDS 治愈的关键和难题。目前的临床药物治疗不能清除体内病毒，对 HIV 慢性感染细胞没有直接的作用，无法治愈 HIV/AIDS。因此，寻找选择性诱导体内 HIV 慢性感染细胞凋亡的药物可能是治疗 HIV 感染的最终解决方法。

我们曾从直接和间接作用两个方面对 TCS 的抗 HIV-1 机制进行过系统地研究。直接作用，是指 TCS 直接作用于病毒颗粒（包括生活周期）；间接作用，是指 TCS 对病毒感染宿主细胞的作用。我们的实验结果表明，TCS 不能阻断 gp120 和 CD4 的相互作用，不能抑制 gp41 的融合功能，不能阻断 HIV-1 进入宿主细胞，体外对 HIV-1 重组的逆转录酶（RT）活性也没有抑制作用，对 HIV-1 病毒粒子的直接杀伤作用也不大（可能是病毒包膜和衣壳对病毒核酸具有保护作用）（Wang，2005）。迄今为止，从 TCS 对 HIV-1 直接作用的研究结果来看，尚不能很好地解释 TCS 的抗病毒活性。

在间接作用方面，我们发现 TCS 能够显著增强 HIV-1 感染细胞的凋亡。TCS（12.5 μg/mL）处理细胞 36 h，流式细胞术检测 HIV-1 慢性感染 H9 细胞的凋亡率为 24.5%，正常 H9 细胞为 8.4%。未处理的对照组，HIV-1 感染或未感染细胞则只表现出本底的凋亡（分别为 2.8% 和 2.9%）（Wang et al，2005）。间接作用似乎能较好地解释 TCS 的 HIV-1 的机制。从另一个视角看，虽然 TCS 能直接作用于裸露的 HIV-1 RNA，使其脱腺嘌呤，其抗病毒机制却可能是通过诱导感染细胞调亡而起间接作用。

TCS 通过受体相关蛋白介导的内吞作用进入细胞（Chan et al，1999，2002，2003）。一方面 TCS 可能通过不同的因素诱发 HIV-1 感染细胞的凋亡：TCS 的脱嘌呤活性或其他酶活性直接损伤病毒或者病毒感染细胞的核酸，造成脱嘌呤，胞质内嘌呤含量的增高会导致线粒体膜电位的降低、细胞色素 C 的释放、活性氧的增加从而诱导细胞凋亡；或者 TCS 选择性进入感染细胞，抑制蛋白的合成，从而影响了抗凋亡因子的表达（如 Bcl-2 家族抗凋亡因子）；另一方面，TCS 则可能由于 HIV-1 感染而使细胞增强了对 TCS 应激的强度，诱发更强烈的导致细胞凋亡的信号转导，如丝裂原激活的蛋白激酶（mitogen-activated protein kinases，MAPK）信号转导等（Wang et al，2005；Ouyang et al，2006）。研究 TCS 有选择性诱导 HIV 感染细胞的凋亡的作用及其机制，探讨细胞凋亡在 TCS 治疗 HIV/AIDS 中的作用很有必要，将为 TCS 治疗 HIV/AIDS 提供理论基础。

3.3 RIPs 诱导的 MAPK 信号转导途径与抗 HIV-1 作用

MAPK 信号转导途径是细胞信号转导主要通路之一，在细胞生长、分化和细胞凋亡中起着重要的作用。一些 RIPs，如 ricin A、a-sarcin、onnamide Adh、Korean mistletoe lectin Ⅱ，以及 shiga toxin 都能激活 MAPK 途径（SAPK/JNK）（Iordanov et al，1997；Kim et al，2000；Lee et al，2005；Smith et al，2003）。RIPs 特异性地作用于保守的 S/R 环并激活 SAPK/JNK 信号转导途径，称之为核糖体毒性胁迫反应（ribotoxic stress response）（Ouyang et al，2005）。TCS 也能以剂量依赖的形式激活 SAPK/JNK。JNK 信号途径的特异性抑制剂 CEP-11004 则能拮抗 TCS 对 HIV-1 在靶细胞中复制的抑制作用。CEP-11004 并不是通过覆盖 TCS 的酶活性中心而起到阻断作用的，因为 CEP-11004 并不能降低高浓度 TCS 的细胞毒性，MAPK 信号转导途径与 TCS 的抗 HIV-1 活性相关（Ouyang et al，2006）。我们的结果还表明，TCS 也有抗 HSV-1 作用，而且与干扰素-α2a（IFN-α2a）和无环鸟苷（acyclovir，ACV）有协同抗 HSV-1 作用（Zheng et al，2002）。TCS 抗 HSV-1 活性可能通过抑制感染细胞的 p38 MAPK 活性和 bcl-2

表达，最终导致病毒感染细胞凋亡而起作用（Huang et al，2006）。以上结果表明，MAPK 家族应该在 TCS 抗病毒机制中起了一定的作用。

另外，TCS 能与化学因子受体 CCR5、CXCR4，以及 CCR1、CCR2B、CCR3 和 CCR4 协同作用，增强了 RANTES（regulated upon activation，normal T cell expression and secreted）和 SDF（stromal cell derived factor）-1α 在淋巴细胞和单核细胞（Jurkat，PBMC 和 THP-1）中刺激的化学趋向性和百日咳毒素敏感的 G 蛋白的激活，并且此激活作用不依赖于 TCS 的 RI 活性（Zhao et al，1999）。CCR5 和 CXCR4 是 HIV-1 感染细胞的辅助受体，TCS 作用于其后引起 G 蛋白激活一系列的后继反应与 TCS 抗 HIV 活性的关系值得研究。

3.4　RIPs 对 HIV-1 整合酶的抑制

植物来源的多种 RIPs 包括 agrostin、gelonin、luffin、saporin、α-MMC、β-MMC 和 TCS 等即使在很高浓度下，并不能有效地抑制 HIV-1 的 RT、水解酶活性以及 CD4/gp120 的相互作用。上述 RIPs 除了 agrostin 外，在 5 μmol/L 浓度下，对整合酶有 26%—96%的抑制作用，其中活性最好的是 luffin 与 saporin，其抑制活性大于 90%，而 EC_{50}分别是 0.53 μmol/L 和 0.25 μmol/L；gelonin、β-MMC 和 TCS 对整合酶的抑制率为 50% – 68%；而 α-MMC 对整合酶的抑制活性最低，只有 26%。进一步研究表明，luffin 与 saporin 能有效地抑制 HIV-1 3′–端的加工与链的转移等整合酶活性（Au et al，2000）。Lee-Huang et al（1995）也证明 MAP30 和 GAP31 能够抑制 HIV-1 3′–端的加工、链转移以及去整合等整合酶活性。

3.5　RIPs 与氧自由基的产生

活性氧（reactive oxygen species，ROS）是指具有氧化活性的以氧原子为中心的分子或自由基，如 $O_2^{-\cdot}$、H_2O_2 和·OH。细胞代谢或受化学物质的刺激都会产生 ROS。ROS 涉及肿瘤的发生、衰老，以及包括 Alzheimer's 和 Parkinson's 等的发病机制。另外，在正常生理活性方面，ROS 还可以作为酶激活细胞生长、分化和凋亡的第二信使。研究发现，TCS 能够以剂量和时间依赖性诱导 JAR 细胞产生 ROS，包括 $O_2^{-\cdot}$、H_2O_2 和·OH。TCS 诱导 ROS 的产生需要，但又并不完全依赖细胞内外的 Ca^{2+}，因为清除细胞内外的 Ca^{2+} 后，TCS 仍能诱导 JAR 细胞产生一定的 ROS，除 Ca^{2+} 信号转导外，其他机制，如 TCS 与细胞受体的相互作用可能对 ROS 的产生也起到一定作用（Zhang et al，2001）。TCS 诱导产生的 ROS 是否与 TCS 选择性诱导感染细胞的凋亡有关也值得进一步研究。

尽管对RIPs的抗HIV-1机制已经进行了较广

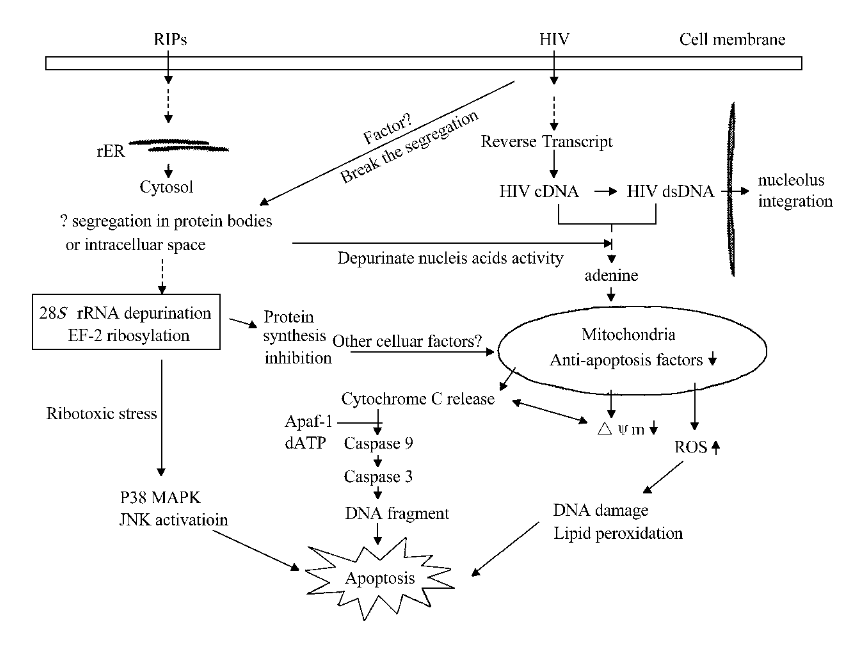


图 1　RIPs 抗 HIV 的可能机制（修改自 Narayanan et al，2005）

Fig. 1　The possible anti-HIV-1 activities of RIPs（Modified from Narayanan et al，2005）

泛的研究，但其确切的机制仍不十分清楚，而根据目前研究的结果表明，RIPs抗HIV-1的作用是多靶点的（图1）（Wang，2005）：（1）RIPs选择性进入或作用于病毒感染的细胞，破坏细胞蛋白质的合成或引起相应的细胞信号转导，抑制病毒的复制和感染，或诱导感染细胞的凋亡；（2）RIPs作用于病毒生活周期的某一环节，或者通过其酶活性，直接破坏病毒核酸。不同来源的RIPs由于性质以及结构的差异，可能除了一定的共同机制外，还可能具有自己独特的抗病毒方式。另外，RIPs对机体的免疫调节作用可能对抑制病毒在体内的复制有一定的积极作用。

4 RIPs的结构改造和修饰

在RIPs抗HIV-1作用研究方面，研究最透彻的应该是TCS，但是作为一种外源性的植物蛋白，TCS是一种很强的免疫原，在体内易导致特异抗体的产生，且能引起中度的神经毒副作用和变态反应。TCS的毒副作用限制了它在临床上的进一步应用。另外，TCS血浆的半衰期很短，大概只有8.4—12.7 min，其分子量为27 kDa，能很快被肾小球过滤(Byers et al，1990，1994；Kahn et al，1994)。如果能通过改造或修饰，在保留RIPs抗HIV活性的同时，降低其神经毒副作用及所引起的变态反应，延长血浆半衰期，RIPs将会是颇有前景的治疗HIV/AIDS药物（Zheng & Ben，1992）。为此，学界进行了多种尝试。

TCS是由247个氨基酸残基组成的蛋白质，不含Cys残基。通过计算机模拟，基于TCS以及TCS与底物结合复合物晶体结构的疏水性结构、链的柔性、表面的暴露、环－转角，以及氨基酸侧链的相互作用，三个位点Ser-7、Lys-173和Gln-219，被确定为TCS的抗原性位点（Chan et al，2000）。Cai et al（2002）利用噬菌体展示技术证实了K173确是TCS其中的一个抗原决定簇位点。我们利用蛋白定点突变技术，把Ser-7、Lys-173和Gln-219突变成Cys，分别构建S7C、K173C和Q219C突变体，然后在新引入的Cys上1∶1偶联PEG20K分子，成功构建了PEG_{20K}-Q219C、PEG_{20K}-K173C和PEG_{20K}-S7C三个PEG化突变体。与TCS相比，S7、K173和Q219显示了较低的对C8166细胞的毒性（Wang et al，2004）；PEG分子偶联后，免疫原性和IgE滴度显著下降，可能原因是PEG分子覆盖了TCS的抗原性位点，阻止了宿主的识别；药物动力学显示，PEG偶联突变体血浆半衰期延长17—22倍；而在活性方面，S7C、Q219C、K173C和PEG_{20K}-K173C流产活性与TCS相当，而PEG_{20K}-S7C和PEG_{20K}-Q219C致小鼠流产活性则增加了3倍（He et al，1999a，b）；但S7、K173和Q219体外抗HIV-1活性下降为18.12%—66.67%，而PEG_{20K}分子的偶联导致抗HIV-1活性进一步下降（降低为0.33%—5%）。抗原决定簇突变引起活性下降的原因可能的解释为：S7、K173和Q219位于蛋白表面，可能与细胞相关受体，如低密度脂蛋白受体相关蛋白（low density lipoprotein - receptor relative protein）的相互作用有关。氨基酸的突变体影响TCS与受体的相互作用，进而影响到入胞效率，导致抗HIV-1活性的下降。但这些氨基酸的突变不会影响体外RI活性，我们实验结果也证实S7C、K173C和Q219C具有与TCS相同的RI活性。而PEG20K偶联后，一方面较大的PEG_{20K}分子掩盖了RI活性中心位点，不能发挥其酶活性，这些PEG化的突变体RI活性也显示出平行下降；另一方面，较大的PEG-TCS突变体偶联物影响了TCS进入细胞。PEG20K-K173C在JAR细胞入胞效率明显小于TCS（Wang et al，2004）。

另外，大分子物质，如Dextran，也被用来偶联到TCS分子上，以增加血浆半衰期和降低免疫原性。Dextran T-40偶联的K173C-TCS，在豚鼠中急性超敏反应显著下降，血浆半衰期由原来的平均10 min延长到平均275 min，大约增长28倍。但Dextran T-40-K173C-TCS复合物只保留了一半的流产活性（Chan et al，1999）。

2005年1月，国家药品和食品监督管理局（SFDA）颁发了一种TCS突变体的抗HIV-1临床研究批文（北京翔天牧生物科技有限公司和中科院上海生科院，批件号：2005L00148），目前正在进行Ⅱ期临床试验。另外，安徽安科生物工程股份有限公司研制的一种PEG偶联TCS也完成了临床前研究，有望获得SFDA的抗HIV-1药物临床研究批文。

5 结 语

抗HIV的化学合成药物具有毒副作用，依从性差，无法根除体内的病毒，易诱导耐药株，且价格昂贵。从传统药物和天然化合物中寻找新的抗

HIV/AIDS 药物或先导化合物，是当前国内外新药研制中非常活跃的重要领域之一。RIPs 因其独特的抗 HIV 活性代表了天然产物抗 HIV/AIDS 的一个重要发展方向。对 RIPs 抗病毒机制、构效关系和修饰的研究，将对 RIP 类药物的理论研究和临床应用具有指导意义。我国在 RIPs 的基础和应用研究方面，有相当强的优势和基础，中医药应用天花粉具有悠久的历史，TCS 应用于临床引产和抗肿瘤也有 20 多年的历史，对其临床应用背景很清楚。TCS 突变体已获得 SFDA 的抗 HIV-1 药物临床研究批文，目前正在进行Ⅰ/Ⅱ期临床试验，我们期待获得好的结果。

参考文献：

Aron GM, Irvin JD. 1980. Inhibition of herpes simplex virus multiplication by the pokeweed antiviral protein [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, **17** (6): 1032 – 1033.

Au TK, Collins RA, Lam TL, Ng TB, Fong WP, Wan DC. 2000. The plant ribosome inactivating proteins luffin and saporin are potent inhibitors of HIV-1 integrase [J]. *FEBS Lett*, **471** (2 – 3): 169 – 172.

Barbieri L, Valbonesi P, Bonora E, Gorini P, Bolognesi A, Stirpe F. 1997. Polynucleotide: Adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: Effect on DNA, RNA and poly (A) [J]. *Nucleic Acids Res*, **25** (3): 518 – 522.

Byers VS, Levin AS, Waites LA, Starrett BA, Mayer RA, Clegg JA, Price MR, Robins RA, Delaney M, Baldwin RW. 1990. A phase Ⅰ/Ⅱ study of trichosanthin treatment of HIV disease [J]. *AIDS*, **4** (12): 1189 – 1196.

Byers VS, Levin AS, Malvino A, Waiter L, Robins RA, Baldwin RW. 1994. A phase Ⅱ study of effect of addition of trichosanthin to zidovudine in patients with HIV disease and failing antiretroviral agents [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **10** (4): 413 – 420.

Cai X, Yao G, Xu G, Yang C, Xu H, Lin Y, Yu J, Sun B. 2002. Identification of the amino acid residues in trichosanthin crucial for IgE response [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **297** (3): 510 – 516.

Chan WL, Shaw PC, Li XB, Xu QF, He XH, Tam SC. 1999. Lowering of trichosanthin immunogenicity by site-specific coupling to dextran [J]. *Biochem Pharmacol*, **57** (8): 927 – 934.

Chan WL, Zheng YT, Huang H, Tam SC. 2002. Relationship between trichosanthin cytotoxicity and its intracellular concentration [J]. *Toxicology*, **177** (2 – 3): 245 – 251.

Chan WY, Huang H, Tam SC. 2003. Receptor-mediated endocytosis of trichosanthin in choriocarcinoma cells [J]. *Toxicology*, **186** (3): 191 – 203.

Chen H, Wang Y, Yan MG, Yu MK, Yao QZ. 1996. 5′-AMP phosphatase activity on trichosanthin and other single chain ribosome inactivating proteins [J]. *Chn Biochem J*, **12** (2): 125 – 130. [陈红, 王　悦, 颜茂恭, 余明琨, 姚启智. 1996. 天花粉蛋白等五种核糖体失活蛋白的 5′-AMP – 磷酸酯酶活性. 生物化学杂志, **12** (2): 125 – 130.]

Endo Y, Mitsui K, Motizuki M, Tsurugi K. 1987. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28*S* ribosomal RNA caused by the toxins [J]. *J Biol Chem*, **262**: 5908 – 5912.

Endo Y, Chan YL, Lin A, Tsurugi K, Wool IG. 1988. The cytotoxins alpha-sarcin and ricin retain their specificity when tested on a synthetic oligoribonucleotide (35-mer) that mimics a region of 28*S* ribosomal ribonucleic acid [J]. *J Biol Chem*, **263** (17): 7917 – 7920.

He XH, Shaw PC, Tam SC. 1999a. Reducing the immunogenicity and improved the *in vivo* activity of trichosanthin by site-directed PEGylation [J]. *Life Sci*, **65**: 355 – 368.

He XH, Shaw PC, Xu LH, Tam SC. 1999b. Site-directed polyethylene glycol modification pf trichosanthin: Effects on its biological activity, pharmacokinetics, and antigenicity [J]. *Life Sci*, **64**: 1163 – 1175.

Hirasawa K, Yoshida O, Fujinami T, Sohma K, Watanabe A. 2000. Adenine-induced selective apoptosis toward HIV chronically infected cells *in vitro* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **273** (3): 1025 – 1032.

Hu HY, Lu ZX. 1994. H-1-NMR study on glycoside cleavage of 5′-AMP catalyzed by trichosanthin [J]. *Chn Sci Bull*, **39** (23): 2014 – 2017.

Huang H, Chan H, Wang YY, Ouyang DY, Zheng YT, Tam SC. 2006. Trichosanthin suppresses the elevation of p38 MAPK, and Bcl-2 induced by HSV-1 infection in vero cells [J]. *Life Sci*, **79** (13): 1287 – 1292.

Hudak KA, Wang P, Tumer NE. 2000. A novel mechanism for inhibition of translation by pokeweed antiviral protein: Depurination of the capped RNA template [J]. *RNA*, **6**: 369 – 380.

Iordanov MS, Pribnow D, Magun JL, Dinh TH, Pearson JA, Chen SL, Magun BE. 1997. Ribotoxic stress response: Activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28*S* rRNA [J]. *Mol Cell Biol*, **17** (6): 3373 – 3381.

Kahn JO, Gorelick KJ, Gatti G, Arri CJ, Lifson JD, Gambertoglio JG, Bostrom A, Williams R. 1994. Safety, activity, and pharmacokinetics of GLQ223 in patients with AIDS and AIDS-related complex [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, **38** (2): 260 – 267.

Kim MS, So HS, Lee KM, Park JS, Lee JH, Moon SK, Ryu DG, Chung SY, Jung BH, Kim YK, Moon G, Park R. 2000. Activation of caspase cascades in Korean mistletoe (*Viscum album* var. *coloratum*) lectin-Ⅱ-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells [J]. *Gen Pharmacol*, **34** (5): 349 – 355.

Lam SK, Ng TB. 2001. Hypsin, a novel thermostable ribosome-inactivating protein with antifungal and antiproliferative activities from fruiting bodies of the edible mushroom *Hypsizigus marmoreus* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **285** (4): 1071 – 1075.

Lee-Huang S, Huang PL, Bourinbaiar AS, Chen HC, Kung HF. 1995. Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by anti-HIV plant proteins MAP30 and GAP31 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92** (19): 8818 – 8822.

Lee KH, Nishimura S, Matsunaga S, Fusetani N, Horinouchi S, Yoshida M. 2005. Inhibition of protein synthesis and activation of stress-activated protein kinases by onnamide A and theopederin B, antitumor marine natural products [J]. *Cancer Sci*, **96** (6): 357 – 364.

Li MX, Yeung HW, Pan LP, Chan SI. 1991. Trichosanthin, a potent HIV-1 inhibitor, can cleave supercoiled DNA *in vitro* [J]. *Nucleic Acids Res*, **19** (22): 6309 – 6312.

McGrath MS, Hwang KM, Caldwell SE, Gaston I, Luk KC, Wu P, Ng VL, Crowe S, Daniels J, Marsh J, Deinhart T, Lekas PV, Vennari

JC, Yeung HW, Lifson JD. 1989. GLQ223: An inhibitor of human immunodeficiency virus replication in acutely and chronically infected cells of lymphocyte and mononuclear phagocyte lineage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**: 2844 – 2848.

Narayanan S, Surendranath K, Namrata B, Surolia A, Karande AA. 2005. Ribosome inativating proteins and apoptosis [J]. *FEBS Lett*, **579**: 1324 – 1331.

Ouyang DY, Wang YY, Zheng YT. 2005. Activation of c-Jun N-terminal kinases by ribotoxic stresses [J]. *Cell Mol Immunol*, **2** (6): 419 – 425.

Ouyang DY, Chan H, Wang YY, Huang H, Tam SC, Zheng YT. 2006. An inhibitor of c-Jun N-terminal kinases (CEP-11004) counteracts the anti-HIV-1 action of trichosanthin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **339** (1): 25 – 29.

Peumans WJ, Hao Q, Van Damme EJ. 2001. Ribosome-inactivating proteins from plants: More than RNA N-glycosidases [J]. *FASEB J*, **9**: 1493 – 1506.

Rajamohan F, Kurinov, IV, Venkatachalam TK, Uckun FM. 1999a. Deguanylation of human immunodeficiency virus (HIV) -1 RNA by recombinant pokeweed antiviral protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **263**: 419 – 424.

Rajamohan F, Venkatachalam TK, Irvin JD, Uckun FM. 1999b. Pokeweed antiviral protein isoforms PAP-Ⅰ, PAP-Ⅱ, and PAP-Ⅲ depurinate RNA of human immunodeficiency virus (HIV) -1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **260** (2): 453 – 458.

Schnell R, Borchmann P, Staak JO, Schindler J, Ghetie V, Vitetta ES, Engert A. 2003. Clinical evaluation of ricin A-chain immunotoxins in patients with Hodgkin's lymphoma [J]. *Ann Oncol*, **14** (5): 729 – 736.

Shih SF, Wu YH, Hung CH, Yang HY, Lin JY. 2001. Abrin triggers cell death by inactivating a thiol-specific antioxidant protein [J]. *J Biol Chem*, **276** (24): 21870 – 21877.

Smith WE, Kane AV, Campbell ST, Acheson DW, Cochran BH, Thorpe CM. 2003. Shiga toxin 1 triggers a ribotoxic stress response leading to p38 and JNK activation and induction of apoptosis in intestinal epithelial cells [J]. *Infect Immun*, **71** (3): 1497 – 1504.

Ussery MA, Irvin JD, Hardesty B. 1977. Inhibition of poliovirus replication by a plant antiviral peptide [J]. *Ann N Y Acad Sci*, **284**: 431 – 440.

Wang JH, Nie HL, Tam SC, Huang H, Zheng YT. 2002. Anti-HIV-1 property of trichosanthin correlates with its ribosome inactivating activity [J]. *FEBS Lett*, **531** (2): 295 – 298.

Wang JH, Nie HL, Tam SC, Huang H, Zheng YT. 2003. Independency of anti-HIV activity from ribosome inactivating activity of trichosanthin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **302** (1): 89 – 94.

Wang JH, Tam SC, Huang H, Ouyang DY, Wang YY, Zheng YT. 2004. Site-directed PEGylation of trichosanthin retained its anti-HIV activity with reduced potency *in vivo* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **317**: 965 – 971.

Wang JH, Zheng YT. 2004. Natural peptides and proteins with anti-HIV activity [J]. *Chn J Nat Med*, **2** (6): 321 – 327. [王建华, 郑永唐. 2004. 天然来源的具有抗 HIV 活性的蛋白和肽类化合物. 中国天然药物, **2** (6): 321 – 327.]

Wang JH. 2005. The structure-function relationship and the mechanism of trichosanthin on HIV-1 [D]. Kunming: Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences. [王建华. 2005. 天花粉蛋白抗 HIV-1 构效关系研究和机制探讨. 中国科学院昆明动物研究所博士学位论文.]

Wang M, Hudak KA. 2006. A novel interaction of pokeweed antiviral protein with translation initiation of factors 4G and iso4G: a potential indirect mechanism of access viral RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, **34** (4): 1174 – 1181.

Wang P, Zoubenko O, Tumer NE. 1998. Reduced toxicity and broad spectrum resistance to viral and fungal infection in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein Ⅱ [J]. *Plant Mol Biol*, **38** (6): 957 – 964.

Wang Y. 2000. Trichosanthin. 2nd ed [M]. Sciences Press. Beijing. [汪 猷. 2000. 天花粉蛋白. 第二版. 北京: 科学出版社.]

Wang YY, Ouyang DY, Huang H, Chan H, Tam SC, Zheng YT. 2005. Enhanced apoptotic action of trichosanthin in HIV-1 infected cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **331** (4): 1075 – 1080.

Waurzyniak B, Schneider EA, Tumer N, Yanishevski Y, Gunther R, Chelstrom LM, Wendorf H, Myers DE, Irvin JD, Messinger Y, Ek O, Zeren T, Langlie MC, Evans WE, Uckun FM. 1997. *In vivo* toxicity, pharmacokinetics, and antileukemic activity of TXU (anti-CD7) -pokeweed antiviral protein immunotoxin [J]. *Clin Cancer Res*, **3** (6): 881 – 890.

Zhang C, Gong Y, Ma H, An C, Chen D, Chen ZL. 2001. Reactive oxygen species involved in trichosanthin-induced apoptosis of human choriocarcinoma cells [J]. *Biochem J*, **355**: 653 – 661.

Zhao J, Ben LH, Wu YL, Hu W, Ling K, Xin SM, Nie HL, Ma L, Pei G. 1999. Anti-HIV agent trichosanthin enhances the capabilities of chemokines to stimulate chemotaxis and G protein activation, and this is mediated through interaction of trichosanthin and chemokine receptors [J]. *J Exp Med*, **190** (1): 101 – 111.

Zheng YT, Ben KL. 1992. Anti-human immunodeficiency virus activity of trichosanthin and its clinical trials [J]. *J Immunol*, **8** (4): 276 –278. [郑永唐, 贲昆龙. 1992. 天花粉蛋白对人艾滋病病毒的作用及其临床试验. 免疫学杂志, **8** (4): 276 – 278.]

Zheng YT, Zhang WF, Ben KL, Wang JH. 1995. *In vitro* immunotoxicity and cytotoxicity of trichosanthin against human normal immunocytes and lekeumia-lymphoma cells [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, **17**: 69 – 79.

Zheng YT. 1997. Anti-human immunodeficiency virus activities of ribosome-inactivating proteins and immunotoxicity of trichosanthin [D]. Kunming: Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences. [郑永唐. 1997. 核糖体失活蛋白抗人免疫缺陷病毒活性和天花粉蛋白的免疫毒理作用. 中国科学院昆明动物研究所博士学位论文.]

Zheng YT, Ben KL. 1997. Ribosome-inactivating proteins with anti-human immunodeficiency virus activities [J]. *Expl Nat*, **16** (2): 62 – 66. [郑永唐, 贲昆龙. 1997. 抗人艾滋病毒的核糖体失活蛋白. 大自然探索, **16** (2): 62 – 66.]

Zheng YT, Ben KL, Jin SW. 1998. Anti-human immunodeficiency virus activity of proteins from 17 species of plants [J]. *Virol Sin*, **13** (4): 312 – 321. [郑永唐, 贲昆龙, 金善炜. 1998. 17 种植物中蛋白质提取物的抗 HIV-1 活性. 中国病毒学, **13**: 312 – 321.]

Zheng YT, Ben KL, Jin SW. 1999. Alpha-momorcharin inhibits HIV-1 replication in acutely but not chronically infected T-lymphocytes [J]. *Acta Pharmacol Sin*, **20** (3): 239 – 243.

Zheng YT, Ben KL, Jin SW. 2000. Anti-HIV-1 activity of trichobitacin, a novel ribosome-inactivating protein [J]. *Acta Pharmacol Sin*, **21** (2): 179 – 182.

Zheng YT, Chan WL, Chan P, Huang H, Tam SC. 2001. Enhancement of the anti-herpetic effects of trichosanthin by acyclovir and interferon [J]. *FEBS lett*, **496** (2 – 3): 139 – 142.